

洛拉曲克对胸苷酸合成酶蛋白质表达水平的动态影响

洛拉曲克(nolatrexed)是新型胸苷酸合成酶抑制剂,脂溶性,进入细胞后直接作用于胸苷酸合成酶(thymidylate synthase, TS),产生抑制作用。它抗癌谱广、毒副作用小[1]、恢复快。II期临床实验证实其对头颈部鳞状上皮癌、非细胞性肺癌、肝细胞癌、胰腺癌以及结肠癌等具有良好的治疗作用[2][3]。由于TS蛋白表达的上调被认为是肿瘤细胞对TS抑制剂耐药的一个重要因素,我们对比研究了正常细胞和肿瘤细胞在洛拉曲克处理后TS动态表达的特点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人大肠癌细胞(LoVo):广州南方医院消化内科惠赠。人正常肝细胞(Lo2):购自上海细胞生物研究所细胞库。

1.1.2 主要试剂 蛋白质Marker(MBI公司),BCA法蛋白质定量试剂盒(PIERCE公司),小鼠单克隆抗体(NeoMarkers公司),山羊抗小鼠辣根过氧化物酶标记IgG(Amersham Pharmacia公司),FITC标记山羊抗小鼠IgG1(Serotec公司)。ECL Western Blot检测试剂盒(Amersham Pharmacia公司),硝酸纤维素膜(Schleicher&schuell公司),DAB(博士德公司),中性红生物染色剂(Sigma公司),结晶紫(上海远航化工厂),异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗鼠IgG(军事医学科学院)。

1.1.3 实验仪器 PAC 3000电泳仪:Bio-Rad公司。半干燥电转仪:Bio-Rad公司。GS-15R低温高速离心机:Beckman公司。DV 530 DNA/蛋白质分析仪:Beckman公司。EPICS ELITE型流式细胞仪:Coulter公司。405型ELISE酶标仪:Bio-Rad公司。

1.2 方法

1.2.1 洛拉曲克处理细胞 细胞培养至对数生长期($2\sim 3 \times 10^6$ 细胞/ml),接种于35 mm的培养皿中生长。当细胞接近70%~80%融合时,用含不同浓度的洛拉曲克培养基孵育不同的时间。

在测定洛拉曲克作用下不同细胞TS蛋白质表达水平动态变化规律时,时间曲线研究的参数为:本研究前期结果显示LoVo、Lo2细胞的 IC_{90} 值为(10.46 ± 1.51) $\mu\text{mol/L}$ 、(79.10 ± 5.80) $\mu\text{mol/L}$ 。因此在LoVo、Lo2细胞使用的洛拉曲克的浓度分别为接近相应 IC_{90} 值的10、75 $\mu\text{mol/L}$,作用时间均分为6个时间点包括0、12、24、36、48、60 h。剂量曲线研究的参数为作用时间36 h,LoVo细胞剂量点分别为:0、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 。Lo2细胞剂量点:0、25、50、75、100、125 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.2.2 流式细胞术 把各个样品从培养皿上消化下来,细胞计数大于 1×10^6 。用PBS-CMF洗1次,25 $^{\circ}\text{C}$,1 500 r/min离心5 min。沉淀用冷的70%乙醇固定过夜。用时2 000 r/min离心5 min弃上清。沉淀加入50 μl 的0.1% NP-40孵育10 min,再离心弃上清。用PBS-CMF洗2次,每次5 min,1 500 r/min弃上清。加入100 μl 小鼠单克隆抗体,阴性对照组则加入相同体积的PBS-CMF,37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒内孵育1 h。用PBS-CMF洗涤2次,每次5 min,1 500 r/min弃上清。加入100 μl 的FITC标记的山羊抗小鼠第二抗体,湿盒内孵育30 min。用PBS-CMF洗2次,每次5 min,1 500 r/min弃上清。最后用1 ml的PBS-CMF重悬沉淀并过筛,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存,待测。

1.2.3 蛋白质的提取 将每个样本的细胞传至75 mm的大培养瓶中培养,当到达指数生长期时,加不同浓度的洛拉曲克培养不同时间。提取蛋白时培养瓶放于冰上,并用预冷的PBS漂洗细胞两次后弃去。再加入预冷的裂解液,20 min后吸取细胞及其碎片于Ep-ependof管中,4 $^{\circ}\text{C}$,12 000 r/min低温高速离心2 min。汲取上清至另一管中,-70 $^{\circ}\text{C}$

保存。

1.2.4 BCA法蛋白质定量 将样品与标准品各取25 μ l于96孔板中,再加200 μ l工作液到每个孔混匀,振荡30 s。盖上盖37 $^{\circ}$ C孵育30 min。室温放冷后在562 nm的酶标仪上检测各个样品蛋白质的含量。

1.2.5 Western blot检测 以BCA法测定蛋白样品浓度后,将各样品调整至等浓度。取等量的蛋白样本按1:1比例与2 \times 凝胶上样缓冲液混合,煮沸3 min,变性蛋白用7.5% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,并用半干燥转膜仪转移到硝酸纤维素膜上。用含1%蛋白干粉的0.02 mol \cdot L PBST液(PBS+0.5%吐温20)室温下封闭膜2 h, PBS洗膜3次后1 μ g/ml一抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜, PBS洗膜3次; 1:2 500辣根过氧化物酶标记的二抗37 $^{\circ}$ C孵育1 h, PBS洗膜3次, DAB显色、扫描照像,并用BIO-PROFIL/BIO-CAPT/BIO-ID++图像分析软件分析。

1.3 统计学处理

流式细胞检测所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,分别利用Dunnet法和SNK法进行检验。

2 结果

2.1 流式细胞术检测结果

2.1.1 LoVo细胞时间曲线 经洛拉曲克处理后的Lo-Vo细胞TS蛋白的表达水平与对照相比呈持续升高的趋势(图1)。

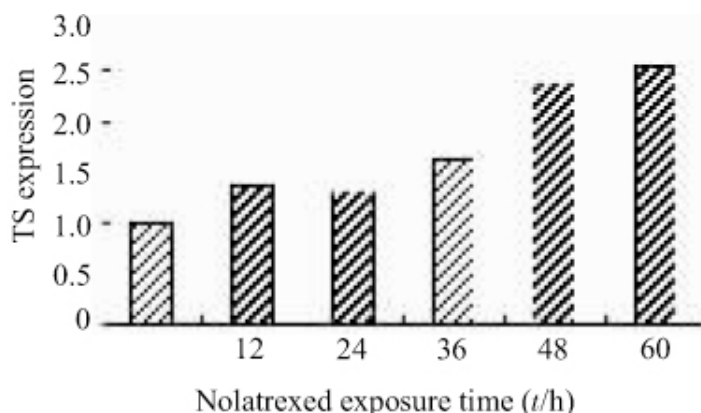


图1 LoVo细胞以10 μ mol/L洛拉曲克处理不同时间TS蛋白表达的动态变化

Fig.1 Dynamic changes of thymidylate synthase(TS) expression in LoVo cells after treatment with 10 μ mol/L nolatrexed for different time intervals

2.1.2 LoVo细胞剂量曲线 经洛拉曲克处理后的LoVo细胞TS蛋白的表达水平的变化呈峰形,以 IC_{90} 值附近为最高(图2)。

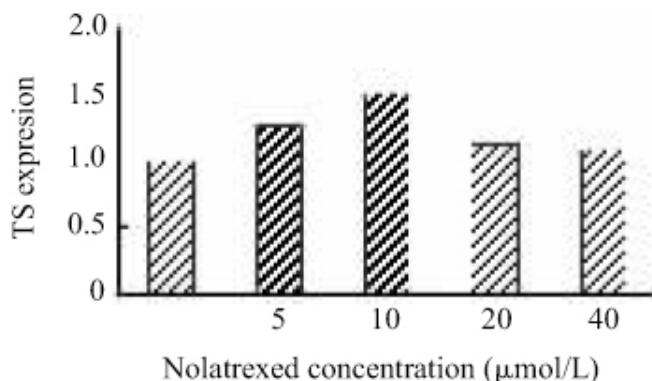


图2 LoVo细胞在经过不同浓度的洛拉曲克处理36 h后的TS蛋白表达水平

Fig.2 TS expression in LoVo cells after treatment with nolatrexed in different concentrations for 36 h

2.1.3 Lo2细胞时间曲线 经洛拉曲克处理后的Lo2细胞TS蛋白的表达水平与对照相比先降低, 24 h后TS蛋白表达水平逐渐回升, 但至60 h尚未恢复至对照水平(图3)。

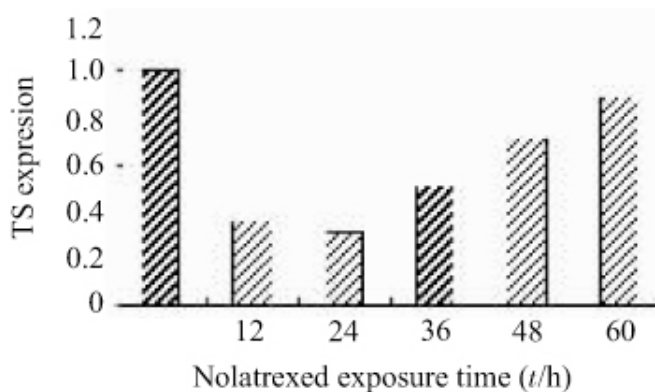


图3 Lo2细胞以75 μmol/L洛拉曲克处理不同时间TS蛋白表达的动态变化

Fig.3 Dynamic changes of TS expression in Lo2 cells after treatment with 75 μmol/L nolatrexed for different time intervals

2.1.4 Lo2细胞剂量曲线 经洛拉曲克处理后的Lo2细胞TS蛋白的表达水平, 在低于IC₉₀值的3个剂量点TS蛋白水平降低程度相似, 高于IC₉₀值的两个剂量处理后TS水平持续下降(图4)。

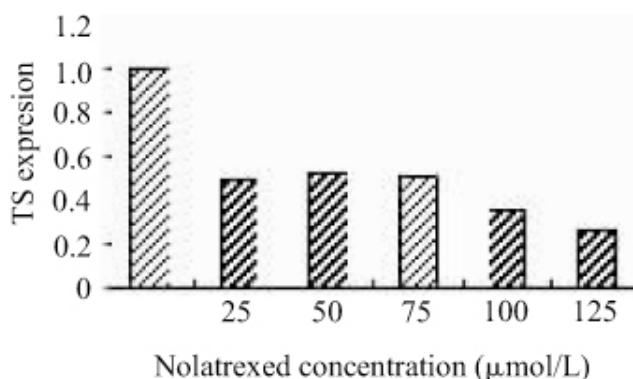


图4 Lo2细胞在经过不同浓度的洛拉曲克处理36 h后的TS蛋白表达水平

Fig.4 TS expression in Lo2 cells after treatment with nolatrexed in different concentrations for 36 h

2.2 Western blot结果

以各自对照细胞TS表达量为1, 以IC₉₀值浓度的洛拉曲克处理36 h后, LoVo和Lo2的TS蛋白表达分别为1.56和0.639 (表1)。

Tab.1 Up-regulation of TS protein expression determined by Western blotting

	LoVo		Lo2	
	Densitometry reading above background	Up-regulated fold (Compared with control)	Densitometry reading above background	Up-regulated fold (Compared with control)
Control	190877	1.000	288025	1.000
IC ₉₀ *-36 h	297817	1.560	184239	0.639

*represents 10 μmol/L and 75 μmol/L in Lo2 and LoVo cell lines, respectively.

胸苷酸合成酶(TS)是参与脱氧核糖核酸生物合成的胸腺嘧啶核苷酸从头合成过程限速酶。研究表明, TS的表达强度与肿瘤的恶性生物学行为密切相关[4]。Nomura等[4]报道在膀胱癌, TS表达高的患者中肿瘤增值抗原表达、血管侵犯、远隔转移率明显高于TS表达低者。TS活性的抑制将直接影响DNA的合成和细胞的分裂增值, 因此是化疗中一个理想的靶点。应用针对TS的化疗药物时, TS的表达水平与化疗效果及预后直接相关。TS水平越高, 疗效和预后越差。

人类TS表达最突出的特点在于TSmRNA的翻译由其自身产物TS负反馈调节控制[5]。TS蛋白抑制TSmRNA翻译是通过结合于后者特定的序列上, 这一序列对于翻译的启动是关键性的, 当TS抑制剂使TS受抑制后, 后者构象发生变化与TSmRNA的结合力降低而从后者上脱落, 于是TSmRNA开始翻译生成TS蛋白。由于这一机制, 在使用TS抑制剂化疗时, 肿瘤细胞可出现TS蛋白表达的增强, 称为TS诱导。TS诱导导致TS蛋白的过度表达, 使TS催化活性升高, 并导致肿瘤细胞的耐药, 这可部分解释临床上对此类药物疗效较差的原因。已有报道这一机制参与多种TS抑制剂耐药性的产生, 包括5-FU、1843U89、ZD1694、AG331、LY231514等[6][7][8][9][10]。从理论上讲, 洛拉曲克发生作用的中间过程简单, 由于具有脂溶性跨膜转运不受还原叶酸载体的影响, 以及不含有谷氨酸侧链而不受叶酸多聚谷氨酰化合成酶的影响, 洛拉曲克作用后TS蛋白表达水平的变化可能是导致细胞对洛拉曲克产生不同敏感性的机制。

在本实验中, 低于 IC_{90} 值的洛拉曲克处理后, 可使存活的LoVo细胞TS蛋白水平上调, 这说明洛拉曲克同样存在TS诱导现象; 而在同样的实验条件下, Lo2细胞中TS蛋白水平降低。上述结果说明在洛拉曲克处理后是否出现TS诱导现象, 以及诱导的速度和诱导的程度, 在LoVo和Lo2细胞是不同的。这一现象是否具有普遍性, 需要进一步对各种类型的细胞进行研究。 IC_{90} 值的不同决定了不同细胞在洛拉曲克处理早期细胞的抑制程度, 但TS诱导程度决定了洛拉曲克长时间作用后细胞的增殖和耐药性。

从本实验结果来看, 降低TS诱导即可降低肿瘤细胞的耐药性, 一个最简单的方法是选择一个最恰当的药物浓度。因为高于 IC_{90} 值的洛拉曲克作用可使存活的LoVo细胞TS蛋白水平上调幅度减小。从而降低TS诱导造成的耐药性形成。

参考文献:

- [1] Creaven PJ, Pendyala L, Meropol NJ, et al. Initial clinical trial and pharmacokinetics of thymitaq™ by 10-day continuous infusion in patients with advanced solid tumors[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 1998, 41: 167-70.
- [2] Mok TSK, Leung TWT, Lee SD, et al. A multi-centre randomized phase II study of nolatrexed versus doxorubicin in treatment of Chi-nese patients with advanced hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 1999, 44: 307-11.
- [3] Pivot X, Wadler S, Kelly C, et al. Result of two randomized trials comparing nolatrexed (Thymitaq) versus methotrexate in patients with recurrent head and neck cancer[J]. Ann Oncol, 2001, 12: 1595-9.
- [4] Nomura T, Nakagawa M, Fujita Y, et al. Clinical significance of thymidylate synthase expression in bladder cancer[J]. Int J Urol, 2002, 9: 368-76.
- [5] Chu E, Koeller DM, Casey JL, et al. Autoregulation of human thymidylate synthase messenger RNA translation by thymidylate synthase[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 8977-81.
- [6] Chu E, Koeller DM, Johnston PG, Regulation of thymidylate synthase in human colon cancer cells treated with 5-fluorouracil and interferon-gamma[J]. Mol Pharmacol, 1993, 43: 527-33.
- [7] Swain SM, Lippman ME, Egan EF, et al. Fluorouracil and high-dose leucovorin in previously treated patients with metastatic breast cancer[J]. J Clin Oncol, 1989, 7: 890-9.
- [8] Estlin EJ, Balmanno K, Calvert AH, et al. The relationship between intrinsic thymidylate synthase expression and sensitivity to THYMI-TAQ in human leukaemia and colorectal carcinoma cell lines[J]. Br J Cancer, 1997, 76(12): 1579-85.
- [9] Shaw D, Berger FG, Spencer HT. Retroviral expression of Escherichia coli thymidylate synthase cDNA confers high-level antifolate resistance to hematopoietic cells[J]. Hum Gene Ther, 2001, 12: 51-9.
- [10] Triest BV, Pinedo HM, Hensbergen YV, et al. Thymidylate synthase level as the main predictive parameter for sensitivity to 5-fluorouracil, but for folate-based thymidylate

synthase inhibitor, in 13 nonselected colon cancer cell lines[J]. Clin Cancer Res, 1999, 5: 643-54.

参考文献:

- [1] Creaven PJ, Pendyala L, Meropol NJ, et al. Initial clinical trial and pharmacokinetics of thymitaq™ by 10-day continuous infusion in patients with advanced solid tumors[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 1998, 41: 167-70.
- [2] Mok TSK, Leung TWT, Lee SD, et al. A multi-centre randomized phase II study of nolatrexed versus doxorubicin in treatment of Chinese patients with advanced hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 1999, 44: 307-11.
- [3] Pivot X, Wadler S, Kelly C, et al. Result of two randomized trials comparing nolatrexed (Thymitaq) versus methotrexate in patients with recurrent head and neck cancer[J]. Ann Oncol, 2001, 12: 1595-9.
- [4] Nomura T, Nakagawa M, Fujita Y, et al. Clinical significance of thymidylate synthase expression in bladder cancer[J]. Int J Urol, 2002, 9: 368-76.
- [5] Chu E, Koeller DM, Casey JL, et al. Autoregulation of human thymidylate synthase messenger RNA translation by thymidylate synthase[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 8977-81.
- [6] Chu E, Koeller DM, Johnston PG. Regulation of thymidylate synthase in human colon cancer cells treated with 5-fluorouracil and interferon-gamma[J]. Mol Pharmacol, 1993, 43: 527-33.
- [7] Swain SM, Lippman ME, Egan EF, et al. Fluorouracil and high-dose leucovorin in previously treated patients with metastatic breast cancer[J]. J Clin Oncol, 1989, 7: 890-9.
- [8] Estlin EJ, Balmanno K, Calvert AH, et al. The relationship between intrinsic thymidylate synthase expression and sensitivity to THYMI-TAQ in human leukaemia and colorectal carcinoma cell lines[J]. Br J Cancer, 1997, 76(12): 1579-85.
- [9] Shaw D, Berger FG, Spencer HT. Retroviral expression of Escherichia coli thymidylate synthase cDNA confers high-level antifolate resistance to hematopoietic cells[J]. Hum Gene Ther, 2001, 12: 51-9.
- [10] Triest BV, Pinedo HM, Hensbergen YV, et al. Thymidylate synthase level as the main predictive parameter for sensitivity to 5-fluorouracil, but for folate-based thymidylate synthase inhibitor, in 13 nonselected colon cancer cell lines[J]. Clin Cancer Res, 1999, 5: 643-54.