

洛拉曲克对胸苷酸合成酶蛋白质表达水平的动态影响

李亦蕾, 吴曙光 (第一军医大学药物研究所, 广东 广州 510515)

摘要:目的 研究洛拉曲克作用后不同细胞胸苷酸合成酶 (TS) 蛋白质表达水平的动态变化有无差异。方法 时间曲线中, LoVo、Lo2 细胞分别用浓度为 10、75 $\mu\text{mol/L}$ (接近各自的 IC_{90} 值) 的洛拉曲克处理 0~60 h。剂量曲线中, 洛拉曲克作用时间 36 h, LoVo 细胞剂量范围 0~40 $\mu\text{mol/L}$ 。Lo2 细胞剂量范围 0~125 $\mu\text{mol/L}$ 。分别以流式细胞术法、Western blot 法检测两种细胞 TS 蛋白表达水平。结果 两种细胞在经过洛拉曲克处理后, TS 表达的时间和剂量曲线具有显著不同的动态规律。在时间曲线中, LoVo 细胞 TS 蛋白的表达水平与对照相比呈持续升高的趋势, 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。在剂量曲线中, 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, Lo2 细胞 TS 蛋白的表达水平, 在低于 IC_{90} 值的剂量点 TS 蛋白水平降低程度相似, 高于 IC_{90} 值的剂量处理后 TS 水平随剂量的升高而下降。结论 洛拉曲克可以产生 TS 诱导现象, 不同细胞在洛拉曲克作用后 TS 动态表达的差异是细胞耐药性不同的原因之一。

关键词:洛拉曲克; 胸苷酸合成酶; 蛋白表达; 耐药性

中图分类号: R979.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588 (2004) 08-0881-04

Effects of nolatrexed on thymidylate synthase protein expression

LI Yi-lei, WU Shu-guang

Institute of Pharmaceutical Sciences, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To study the dynamic changes in thymidylate synthase (TS) expression in different cell lines treated with nolatrexed. **Methods** For studying the time course of the action of the drug, LoVo and Lo2 cells were treated separately with nolatrexed at the concentrations of 10 and 75 $\mu\text{mol/L}$ (approximately their respective IC_{90} value) for 0 to 60 h, while in the dose response study, treatment with nolatrexed for 36 h was performed with the dose range of 0 to 40 $\mu\text{mol/L}$ for LoVo cells and 0 to 125 $\mu\text{mol/L}$ for Lo2 cell. TS expression was detected by flow cytometry and Western blotting. **Results** The dynamic changes in TS expression with respect of the time course and dose response differed significantly in the two cell lines after nolatrexed treatment. In the time course study, TS expression increased continuously in LoVo cells, as compared with that in the control cells, whereas the TS expression initially decreased and then began to increase gradually 24 h after the treatment, remaining still below the control level after 60 h. In the dose response study, TS expression in LoVo cells gave rise to a peak in the curve, with the peak level approaching the IC_{90} value. In Lo2 cells, when the concentration of nolatrexed was below the IC_{90} value, the decrement in TS expression were similar, but as the concentration exceeded the IC_{90} value, TS expression decreased dose-dependently. **Conclusion** Nolatrexed may elicit TS induction in the cells, and the difference in the dynamic changes of TS expression between different cell lines after nolatrexed treatment contributes to different profiles of drug resistance.

Key words: nolatrexed; thymidylate synthase; protein expression; drug resistance

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

收稿日期: 2003-12-18

作者简介: 李亦蕾 (1976-), 女, 2003 年毕业于第一军医大学, 博士, 讲师
通讯作者: 吴曙光, 博士生导师, 教授, 电话: 020-61648171

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 Eppendorf 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 μl 于 96 孔板中,再加 200 μl 工作液到每个孔混匀,振荡 30 s。盖上盖 37 $^{\circ}\text{C}$ 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/L PBST 液(PBS+0.5%吐温 20)室温下封闭膜 2 h,PBS 洗膜 3 次后 1 $\mu\text{g/ml}$ 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 LoVo 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)。

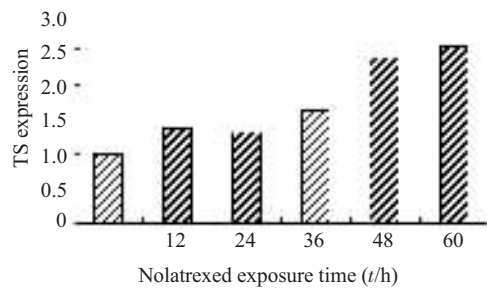


图 1 LoVo 细胞以 10 $\mu\text{mol/L}$ 洛拉曲克处理不同时间 TS 蛋白表达的动态变化

Fig.1 Dynamic changes of thymidylate synthase (TS) expression in LoVo cells after treatment with 10 $\mu\text{mol/L}$ 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)。

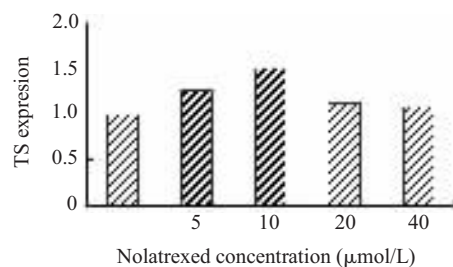


图 2 LoVo 细胞在经过不同浓度的洛拉曲克处理 36 h 后的 TS 蛋白表达水平

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)。

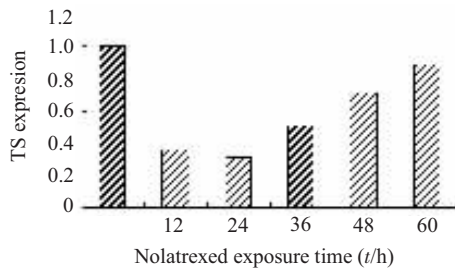


图 3 Lo2 细胞以 75 $\mu\text{mol/L}$ 洛拉曲克处理不同时间 TS 蛋白表达的动态变化

Fig.3 Dynamic changes of TS expression in Lo2 cells after treatment with 75 $\mu\text{mol/L}$ 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 IC_{90} 值的 3 个剂量

点 TS 蛋白水平降低程度相似,高于 IC_{90} 值的两个剂量处理后 TS 水平持续下降 (图 4)。

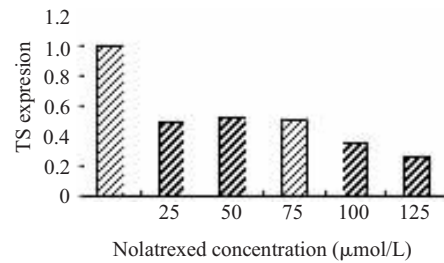


图 4 Lo2 细胞在经过不同浓度的洛拉曲克处理 36 h 后的 TS 蛋白表达水平

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 IC_{90} 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 $\mu\text{mol/L}$ and 75 $\mu\text{mol/L}$ in Lo2 and LoVo cell lines, respectively.

3 讨论

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^[5]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^[6-10]。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 IC₉₀ 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 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 THYMIDTAQ 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.

医学综述》杂志征稿

《医学综述》杂志是由卫生部主管的国家级大型医学专业期刊。《医学综述》已被《中国学术期刊(光盘版)》和《中国期刊网》、《中文科技期刊数据库》、《中文生物学期刊文献库(CMCC)》全文收录;是中国学术期刊综合评价数据库统计源和中国期刊全文数据库全文收录期刊。本刊为月刊(刊号:ISSN 1006-2084; CN 11-3553/R, 邮发代号:6-106)。设有分子生物医学、免疫学、遗传学、心血管疾病、呼吸系疾病、消化系疾病、血液肿瘤疾病、泌尿(生殖)系疾病、内分泌代谢病、风湿性疾病、临床药学、临床检验、影像学、中医中药、急救医学、传染性疾病等栏目。

为了进一步满足广大读者和作者的要求,更好地为临床和科研人员服务,缩短文章的刊载周期,《医学综述》自 2005 年起扩增页码加大载文量,增加临床研究的论著文章,欢迎作者踊跃投稿。立项课题及基金资助项目的文章优先刊登。

投稿地址:天津医科大学第二医院《医学综述》(300211)

联系电话:022-24397446 13920554371

E-mail:sunhf@public.tpt.tj.cn yxzs@chinajournal.net.cn