

## 转染结构性雄烷受体对丝裂霉素 C 和 5-氮丙啶-3-羟甲基-1-甲基吲哚-4,7-二酮的细胞毒性的影响

张江虹<sup>1</sup>, 郝福荣<sup>2</sup>, 孔肇路<sup>1</sup>, 沈芝芬<sup>1</sup>, 金一尊<sup>1\*</sup>

(1. 复旦大学放射医学研究所, 上海 200032; 2. 潍坊市人民医院, 山东 潍坊 261041)

**摘要:** 研究丝裂霉素 C (MMC) 及其衍生物 5-氮丙啶-3-羟甲基-1-甲基吲哚-4,7-二酮 [5-(aziridin-1-yl)-3-hydroxymethyl-1-methylindole-4,7-dione, 629] 的细胞毒性, 以及结构性雄烷受体 (constitutive androstane receptor, CAR) 转染对其生物学效应的影响。将质粒 mCAR/pCR3 转染 HepG2 细胞, 经 G418 耐药性筛选获得转染 CAR 的 g2car 细胞, 以转染空载体 pCR3 (HepG2/pCR3) 作为对照。用 RT-PCR 检测质粒和 CYP2B6 mRNA 的表达, 用 MTT 法评价 MMC 和 629 对 g2car 细胞和 HepG2 细胞在有氧和缺氧条件下的细胞毒性。RT-PCR 检测到 CAR 和 CYP2B6 mRNA 在 g2car 细胞中有表达, 在 HepG2 细胞中无表达; 此外, 在缺氧情况下, MMC 和 629 的细胞毒性比在有氧情况下均有所增加 ( $P < 0.05$ ), 并且转染 CAR 以后, 两者的细胞毒性均增加, 但对 MMC 的影响较明显 ( $P < 0.05$ ), 对 629 的影响不明显 ( $P > 0.05$ )。提示 CAR 可在转录水平调节药物的代谢, 提高药物的毒性; CYP2B6 可以主要代谢 MMC, 但不主要代谢 629。转染 CAR 基因可以增加细胞 CYP2B6 mRNA 的表达, 并可引起 MMC 和 629 毒性的改变。

**关键词:** 丝裂霉素 C; 5-氮丙啶-3-羟甲基-1-甲基吲哚-4,7-二酮; 细胞毒性; 生物还原活性物; 结构性雄烷受体; 细胞色素 P450

中图分类号: R963; R979.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2007)04-0371-05

## Effect of constitutive androstane receptor on the cytotoxicity of mitomycin C and 5-(aziridin-1-yl)-3-hydroxymethyl-1-methylindole-4,7-dione

ZHANG Jiang-hong<sup>1</sup>, HAO Fu-rong<sup>2</sup>, KONG Zhao-lu<sup>1</sup>, SHEN Zhi-fen<sup>1</sup>, JIN Yi-zun<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Radiation Medicine, Fudan University, Shanghai 200032, China;

2. Weifang People's Hospital, Weifang 261041, China)

**Abstract:** This study is to evaluate the cytotoxicity of mitomycin C (MMC) and its analogue 5-(aziridin-1-yl)-3-hydroxymethyl-1-methylindole-4,7-dione (629) as well as the effect of transfection of constitutive androstane receptor (CAR) on their biological effects. HepG2 cells were transfected with the plasmids mCAR1/pCR3 mediated by liposome. Vector pCR3 was used as control. Transfected cells were screened by G418 resistance and limiting dilution. The expressions of plasmid mCAR1/pCR3 and CYP2B6 mRNA were detected by RT-PCR; Cytotoxicities of MMC and 629 *in vitro* were evaluated in g2car cells and HepG2 cells by MTT method under anaerobic and aerobic conditions. mRNA expression of CAR and CYP2B6 can not be detected in HepG2 cells and HepG2/pCR3 cells but can in g2car cells. It is shown that plasmid mCAR1/pCR3 was transfected into g2car cells successfully and target CYP2B6 was transactivated by CAR. To compare with aerobic and anaerobic, the cytotoxicities of MMC and 629 to HepG2 cells and g2car cells had significantly enhanced ( $P < 0.05$ ), and transfect CAR gene can improve the cytotoxicity of MMC ( $P < 0.05$ ), but not 629 ( $P > 0.05$ ). Furthermore, CYP2B6 is one master

收稿日期: 2006-07-22.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30400089).

\* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 21 - 64037993, E-mail: yzjin@shmu.edu.cn

enzyme for the metabolism of MMC and not 629. Transfection of CAR can increase expression of CYP2B6 mRNA in HepG2 cells, and can affect cytotoxicities of MMC and 629.

**Key words:** mitomycin C; 5-(aziridin-1-yl)-3-hydroxymethyl-1-methylindole-4,7-dione; cytotoxicity; bioreductive drugs; constitutive androstane receptor; cytochrome P-450

由于实体肿瘤内不同程度地存在乏氧细胞,使肿瘤对射线和化疗药物敏感性差,并易引起肿瘤的复发。生物还原活性物是针对这些乏氧细胞的选择性细胞毒前药,在乏氧条件下经体内的生物还原酶活化产生细胞毒性代谢产物,可以增强放疗和化疗的效果,是今后肿瘤增敏药物研发的方向之一<sup>[1,2]</sup>。

MMC是目前唯一用于临床的醌类生物还原物,其辐射增敏效应明确,临床抗肿瘤谱广,对食道癌、胰腺癌、乳腺癌<sup>[3]</sup>等均有疗效。但由于其乏氧选择性不够理想,毒副作用较大,限制了使用。而629是以MMC为先导化合物合成的醌类化合物,初步研究显示具有良好的乏氧选择性,在乏氧条件下具有更强的杀伤作用,值得对其作用机制进行深入了解。另外,细胞色素P450是哺乳动物肝脏药物代谢的主要酶类。在肿瘤治疗中,它不仅参与大量抗肿瘤药的代谢转化,还在一些与细胞增殖分化有关的内源性物质的代谢中发挥重要作用<sup>[4,5]</sup>。因此P450同工酶的活性改变也会影响到肿瘤治疗的疗效。本研究以HepG2细胞为材料转染CAR,确定在CYP2B6表达增高的情况下MMC和629细胞毒性的改变。

## 材料和方法

**试剂** Lipofectamine 2000购于Invitrogen(Faraday Avenue Carlsbad, California);限制性核酸内切酶(BamH I和Xho I)、TaKaRa PCR Amplification Kit和TaKaRa One Step RNA PCR Kit(AMV)均购自TaKaRa Biotechnology(大连);UNIQ-10柱式总RNA抽提纯化试剂盒和UNIQ-10柱式基因组DNA抽提试剂盒购于生工生物工程技术服务有限公司(上海);QIAGEN质粒DNA纯化试剂盒(Mega Kit)购自基因公司;G418购于CALBIOCHEM EMD Biosciences Inc(San Diego, CA);pUC MIX Marker 8购于MBI Fermentas(德国);丝裂霉素C(MMC)购于Sigma Chemical Co(St. Louis, MO);mCAR1/pCR3质粒由NIH/NIEHS的Mack Sobhany和Masahiko Negishi教授馈赠;所有引物均由赛百盛基因技术有限公司合成(北京)。

**质粒 mCAR1/pCR3 的转化** 用双蒸水溶解 mCAR1/pCR3,加入感受态 DH5 中混匀,冰浴 30

min, 42 °C 热休克 90 s,立即置冰浴 5 min,加入 LB 培养液,1.61 × g 振荡培养 45 min(37 °C),1 006.2 × g 离心 3 min,弃上清液,留约 100 μL 液体悬浮菌体,均匀涂布于含 G418 的 LB 平板上,37 °C 培养 16 ~ 20 h。

**质粒 DNA 的大量制备** 依照 QIAGEN Plasmid Mega Kit 说明大量纯化 mCAR1/pCR3 质粒 DNA,并用微量紫外分光光度仪测定 DNA 溶液的  $A_{260\text{ nm}}$  和  $A_{280\text{ nm}}$  值,以  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  比值判断 DNA 的纯度(比值为 1.9 时达纯度要求),将质粒 DNA 调整为  $1\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ,置 -20 °C 冻存备用。

**质粒 mCAR1/pCR3 的鉴定** 将 PCR 反应所有试剂按比例混合,分装于 Eppendorf 管,25 μL/管,然后用无菌牙签挑取菌落涂于管底,将预变性时间延长至 15 min,反应条件和其他程序同上。以 mCAR1U/mCAR1D 为正反向引物进行 PCR,鉴定 mCAR1 基因是否插入质粒;以 T7U/mCAR1D 为正反向引物进行 PCR,鉴定基因片段的插入方向。抽取 PCR 阳性克隆的质粒 DNA,以 BamH I/Xho I 进行双酶切,观察能否切下 1 087 bp 的产物。以 DNA 序列分析验证目的基因的读码框架是否准确。

**转染** 实验设转染 mCAR1/pCR3 组(所得细胞称为 g2car)、转染 pCR3 空载体组(所得细胞在文中称为 HepG2/pCR3)和非转染组,每组 3 个复孔。按 Invitrogen 提供的说明操作。以含  $0.8\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  G418 的 RPMI 1640 完全培养基(含 10% 小牛血清)筛选,每隔 3 ~ 4 d 换液,直至出现 G418 抗性细胞克隆,收集抗性细胞,有限稀释后加入 96 孔平底细胞培养板,使每孔细胞分别达 5 个、1 个、0.5 个和 0.25 个,置 CO<sub>2</sub> 孵箱培养。定期观察每孔细胞的生长及细胞克隆数,2 周后将呈单克隆生长的细胞孔细胞转种 24 孔板进行扩增培养。收获扩增后的单克隆细胞冻存备用。

**基因组 DNA 抽提和总 RNA 抽提** 分别按 UNIQ-10 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒和总 RNA 抽提纯化试剂盒说明书操作。

**PCR 和 RT-PCR** PCR 鉴定和检测质粒 mCAR1/pCR3 按 TaKaRa PCR Amplification Kit 试剂盒说明书操作。RT-PCR 检测 mCAR1/pCR3 及

CYP2B6 表达按 TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV)试剂盒说明书操作。

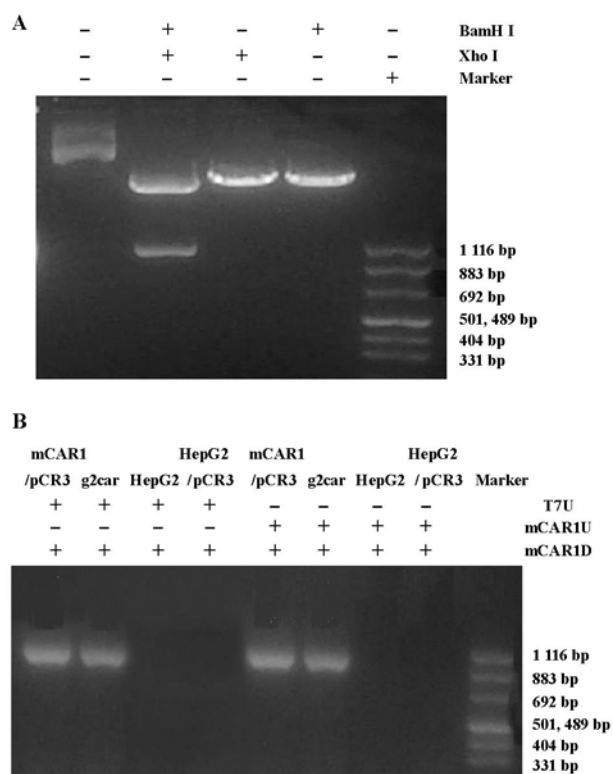
MMC及其类似物 629的细胞毒性 待 HepG2 细胞和 g2car 细胞进入对数生长期后,消化,调细胞数至  $1 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ , 200  $\mu\text{L}$  孔接种 96 孔板。24 h 后分别换含不同浓度的 MMC和 629,乏氧组通  $\text{N}_2$ , 然后于  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  继续培养, 4 h后,换不含药物的完全培养基培养 3 d, 隔天换液。实验结束前 4 h加入  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  MTT 20  $\mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  继续培养 4 h,吸弃培养液,加入 DMSO 200  $\mu\text{L}$ ,于 570 nm测定吸收度。

统计分析 对不同情况下 MMC和 629的细胞毒性的用 GraphPad Prism 软件计算其各自的  $\text{IC}_{50}$ , 各组之间的比较使用 *t* 检验。

## 结果

### 1 质粒 mCAR1/pCR3的鉴定和检测

用 BamH I和 Xho I双酶切质粒 mCAR1 /pCR3 后,琼脂糖凝胶电泳发现 1 087及 3 971 bp两个条带(图 1A)。分别以 g2car 细胞的基因组 DNA, mCAR1 /pCR3为模板, mCAR1 U/mCAR1 D为引物,

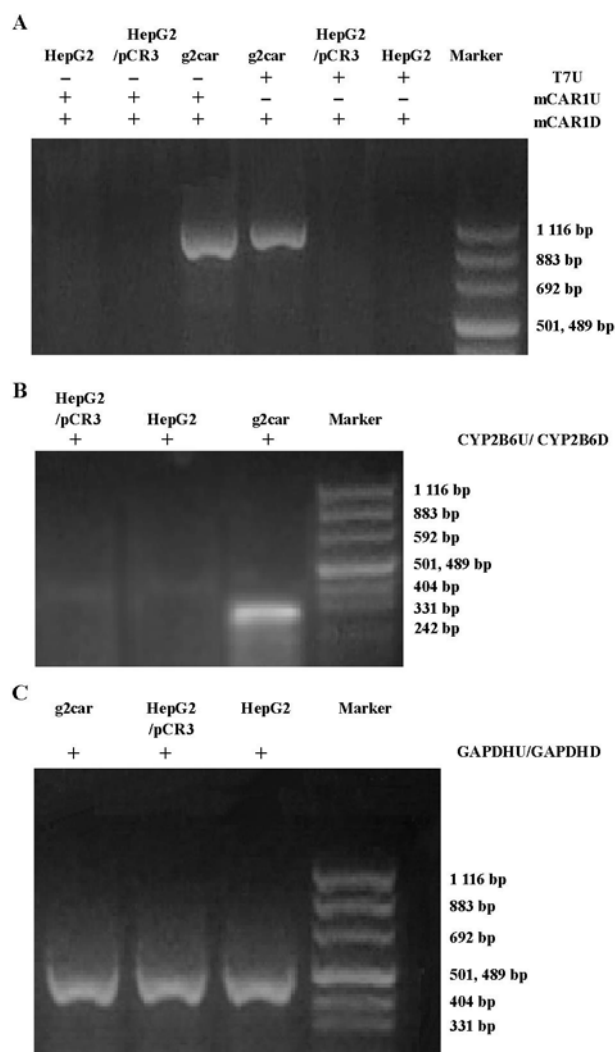


**Figure 1** Identification of recombination plasmid mCAR1 /pCR3. A: Double digestion with BamH I and Xho I; B: T7U/mCAR1D or mCAR1 U/mCAR1D amplification

均可扩增出 1 个 1 087 bp 大小的 PCR 产物,以 T7U/mCAR1 D为引物均可扩增出 1 个 1 132 bp 的产物,而以 HepG2 或 HepG2 /pCR3 细胞的基因组 DNA为模板时,上述两种引物都没有 PCR 产物(图 1B),说明 mCAR1 正向插入质粒 pCR3,并顺利转染入 HepG2 细胞。质粒 mCAR1 /pCR3 经 DNA 序列分析发现, T7 和 SP6 启动子之间的序列包含了正向全长的 mCAR1 CDS。

### 2 质粒 mCAR1/pCR3和 CYP2B6的表达

琼脂糖电泳发现,以 g2car 细胞总 RNA 为模板, T7U/mCAR1 D, mCAR1 U/mCAR1 D或 CYP2B6U /CYP2B6D为引物,可分别扩增出 1 132,1 087 及 276 bp 大小的 RT-PCR 产物;而以 HepG2 或 HepG2 /pCR3 细胞的总 RNA 为模板,上述 3 种引物都没有产物出现(图 2)。



**Figure 2** mRNA expression of the recombinant plasmid mCAR1 /pCR3 ( A) and CYP2B6 mRNA ( B) in HepG2, HepG2 /pCR3 and g2car cells detected by RT-PCR ( C)

### 3 MMC和 629的细胞毒性

由表 1 可知,在乏氧条件下,MMC对 HepG2 细胞和 g2car细胞的 IC<sub>50</sub>分别为 161.9 和 116.7 ng• mL<sup>-1</sup>,有氧条件下分别为 394.9 和 146.3 ng• mL<sup>-1</sup>,MMC对两种细胞的乏氧细胞毒比(hypoxic cytotoxicity ratio, HCR)分别为 2.44 ( $P < 0.05$ )和 1.25 ( $P < 0.05$ )。表明乏氧条件下,MMC对 HepG2细胞和 g2car细胞的毒性均有所增高;另外,在乏氧条件下,629对这两种细胞的 IC<sub>50</sub>分别为 14.94和 11.29 ng• mL<sup>-1</sup>,有氧条件下分别为 59.90 和 47.08 ng• mL<sup>-1</sup>,其 HCR分别是 4.00 ( $P < 0.05$ )和 4.17 ( $P < 0.05$ ),表明乏氧情况下,629对 HepG2细胞和 g2car细胞的毒性也较有氧条件下有所增加。此外,比较 HepG2细胞和 g2car细胞的毒性,在乏氧条件下,MMC和 629对 g2car细胞的 IC<sub>50</sub>分别为 116.7和 11.29 ng• mL<sup>-1</sup>,分别比 HepG2细胞减少了 45.2 ng• mL<sup>-1</sup> ( $P < 0.05$ )和 3.65 ng• mL<sup>-1</sup> ( $P > 0.05$ );而在有氧条件下,MMC和 629对 g2car细胞的 IC<sub>50</sub>分别为 146.3和 47.08 ng• mL<sup>-1</sup>,分别比 HepG2细胞减少了 248.6 ng• mL<sup>-1</sup> ( $P < 0.05$ )和 12.82 ng• mL<sup>-1</sup> ( $P > 0.05$ ),提示转染了 CAR后,两种细胞对两种药物的敏感性均有所增加,但增加的程度不一样,CAR对 MMC的细胞毒性影响程度比 629大。此外,比较 MMC和 629的毒性(表 1),不论是在乏氧情况下还是有氧情况下,不论是 HepG2细胞还是 g2car细胞,629的 IC<sub>50</sub>值均比 MMC低:对于 HepG2细胞,在乏氧条件下,629的 IC<sub>50</sub>值比 MMC下降了 147.51 ng• mL<sup>-1</sup>,在有氧条件下下降了 333.81 ng• mL<sup>-1</sup>;对于 g2car细胞,在乏氧情况下,629的 IC<sub>50</sub>值比 MMC下降了 104.27 ng• mL<sup>-1</sup>,在有氧条件下下降了 93.32 ng• mL<sup>-1</sup>。提示 629的细胞毒性强于其母体药物 MMC。

**Table 1** IC<sub>50</sub> of MMC and 629 in different conditions and the hypoxic cytotoxicity ratio (HCR)

Drug	Cell line	IC <sub>50</sub> /ng• mL <sup>-1</sup>		HCR (air/N <sub>2</sub> )
		Air	N <sub>2</sub>	
MMC	HepG2	394.9 (291.8 - 534.5)	161.9 (137.4 - 188.8)	2.44
	g2car	146.3 (129.8 - 165.0)	116.7 (100.6 - 135.4)	1.25
629	HepG2	59.90 (44.23 - 81.12)	14.94 (12.77 - 17.47)	4.00
	g2car	47.08 (36.30 - 61.06)	11.29 (7.986 - 15.97)	4.17

### 讨论

乏氧细胞普遍存在于各种类型的实体肿瘤中,其对射线和抗癌药物的抗性往往是肿瘤复发的根源。虽然乏氧区的存在妨碍了肿瘤治疗疗效的提高,但由于其为肿瘤组织所特有,也可以成为抗癌药物作用的靶点。生物还原药物正是利用了乏氧细胞的酶系特点,选择性地作用于乏氧的肿瘤细胞,成为兼有细胞毒性的新一代的抗肿瘤增敏药。吡啶酮类生物还原药物的先导化合物 MMC是一种天然产物,目前常与其他抗癌药物合用于治疗胸部、头颈部肿瘤、非小细胞肺癌、膀胱癌和食管癌<sup>[6,7]</sup>等。但是 MMC作为乏氧增敏剂主要存在两大不足。首先,乏氧选择性不够理想。这主要由 MMC的抗癌机制所决定:MMC结构中的醌在还原酶的作用下形成氢醌,后者与 DNA产生交联;同时 MMC结构中还有一个氮丙啶的结构,也可充当烷化剂,在有氧条件下也可损伤细胞,这是 MMC乏氧选择性不强的主要原因之一。另外,参与 MMC活化的主要还原酶 NAD(P)H:喹啉氧化还原酶(NQO1)在有氧和乏氧条件下都起作用<sup>[8]</sup>,这也是 MMC乏氧选择性比较弱的原因之一。其次,毒副作用比较强,尤其是对泌尿系统的损伤。以上因素限制了 MMC的广泛使用<sup>[9]</sup>。因此,在 MMC基础之上进行了结构改造,获得了一系列新化合物,希望能够筛选出低毒高效的乏氧增敏药物,如人参皂苷 RH1, 629, 629AC等。本研究观察到在乏氧和有氧条件下,629的选择性细胞毒性均较其先导化合物 MMC有所增加,并且具有良好的乏氧选择性,作为乏氧增敏药物具有一定的应用前景,值得对其作用机制进行深入的研究。

众所周知,生物还原酶是生物还原活性药物发挥作用的关键,并直接影响药物的药代和药效。研究何种生物还原酶活化特定的生物还原药物不仅可以为临床合理用药提供理论依据和指导,还可为新型生物还原药物的设计提供依据。

CYP2B6是哺乳动物细胞色素 P450超家族的一员,其人的表型是 CYP2B6,参与多种醌类生物还原活性物的生物活化<sup>[10]</sup>。以往研究活化醌类生物还原活性物的还原酶材料主要是哺乳动物肝原代细胞,转染 CYP2B6基因的肿瘤细胞、微粒体或钝化酶。转染 CYP2B6基因需要考虑 CYP2B6在细胞内的定位,也增加了难度,而且全长基因(3 052 bp)转染难度更大,转染部分基因又可能影响 CYP2B6功能;而微粒体或钝化酶则不适于研究生物还原活性物的细胞毒性效应,而且有别于细胞和整体条

件<sup>[11]</sup>。动物细胞和人的肝细胞则存在种属差异。这些因素在增加活化生物还原活性物还原酶研究难度的同时,也给研究结果的正确性带来了疑问。近年来发现,孤核受体超家族可以调节 I 相酶、II 相酶和选择性药物转运蛋白的表达。并且核受体作为一类转录因子,其本身可被特异激活或抑制的属性使它成为药物作用的良好靶标。CAR 是孤核受体家族的一员,可以在转录水平激活 *g2car* 细胞 CYP2B6 基因的启动子,诱导其 mRNA 表达<sup>[12-14]</sup>。在本实验中双酶切、PCR 分析证实,目的基因 *mCAR1* 的全长 CDS 正向插入质粒 *pCR3*,并顺利转染入 *g2car* 细胞;RT-PCR 的结果则表明,质粒 *mCAR1/pCR3* 携带的目的基因在 *g2car* 细胞内表达,并顺利激活了 CYP2B6 mRNA 的表达。而 HepG2 细胞没有检测到 CYP2B6 mRNA 的表达。同时通过研究 MMC 和 629 对 HepG2 细胞和转染有 CAR 孤核受体的 *g2car* 细胞的细胞毒性,发现经 CAR 介导的 CYP2B6 活性表达增高可增加 MMC 的细胞毒性 ( $P < 0.05$ ),但对于 MMC 的衍生物 629 毒性的增加程度不明显 ( $P > 0.05$ ),这提示,629 能被 CYP2B6 所代谢,但不占主导地位,还需要进一步鉴定代谢 629 的主要代谢酶类,这为今后生物还原活性药物的设计,尤其是酶靶向的生物还原活性药物的设计提供了重要的理论依据。

## References

- [1] Zheng XL, Jin YZ, Shen Y. Sensitizer for Cancer Therapy (肿瘤治疗增敏药) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishers, 2002: 49 - 58.
- [2] Sun ZS, Zhu Z. Research advancement of interaction of drug metabolism [J]. Drug Untoward React J, 2000: 6 - 14.
- [3] Bradner WT. Mitomycin C: a clinical update [J]. Cancer Treat Rev, 2001, 27: 35 - 50.
- [4] Patterson LH, Murray GI. Tumour cytochrome P450 and drug activation [J]. Curr Pharm Des, 2002, 8: 1335 - 1347.
- [5] Murray GI. The role of cytochrome P450 in tumour development and progression and its potential in therapy [J]. J Pathol, 2000, 192: 419 - 426.
- [6] Koya MP, Simon MA, Soloway MS, et al. Complications of intravesical therapy for urothelial cancer of the bladder [J]. J Urol, 2006, 179: 2004 - 2010.
- [7] Trumper M, Ross PJ, Cunningham D, et al. Efficacy and tolerability of chemotherapy in elderly patients with advanced oesophago-gastric cancer: a pooled analysis of three clinical trials [J]. Eur J Cancer, 2006, 42: 827 - 834.
- [8] Jaffar M, Phillips RM, Williams KJ, et al. 3-Substituted-5-aziridiny-1-methylindole-4,7-diones as NQO1-directed antitumour agents: mechanism of activation and cytotoxicity *in vitro* [J]. Biochem Pharm, 2003, 66: 1199 - 1206.
- [9] Ekelund S, Persson I, Larsson R, et al. Interactions between the new cytotoxic drug CHS 828 and amiloride and mitomycin C in a human tumour cell line and in tumour cells from patients [J]. Chemotherapy, 2002, 48: 196 - 204.
- [10] Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Drocourt L, et al. The expression of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 genes: a tangle of networks of nuclear and steroid receptors [J]. Biochim Biophys Acta, 2003, 1619: 243 - 253.
- [11] Thasler WE, Dayoub R, Muhlbauer M, et al. Repression of cytochrome P450 activity in human hepatocytes *in vitro* by a novel hepatotrophic factor, augmentor of liver regeneration [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 316: 822 - 829.
- [12] Willson TM, Kliewer SA. PXR, CAR and drug metabolism [J]. Nat Rev Drug Discov, 2002, 1: 259 - 266.
- [13] Sonoda J, Rosenfeld JM, Xu L, et al. A nuclear receptor-mediated xenobiotic response and its implication in drug metabolism and host protection [J]. Curr Drug Metab, 2003, 4: 59 - 72.
- [14] Wyde ME, Kirwan SE, Zhang F, et al. Di-n-butyl phthalate activates constitutive androgen receptor and pregnane X receptor and enhances the expression of steroid-metabolizing enzymes in the liver of rat fetuses [J]. Toxic Sci, 2005, 86: 281 - 290.