

多药抗药性的产生与谷胱甘肽的关系*

王庆端 李国栋 刘梅筠 张予 刘健 张覃沐

(河南省医学科学研究所药理室, 郑州 450052)

摘要 用荧光法对 EAC 及 EAC/ADR 细胞内 GSH 含量进行测定, 发现 EAC/ADR 细胞内 GSH 含量较 EAC 细胞明显增高, 分别为 1.25 ± 0.35 及 $0.31 \pm 0.12 \mu\text{g}/10^6$ 细胞; 但若对 EAC/ADR 细胞株停用 ADR 治疗 36 周后, 则能使该细胞株部分恢复其敏感性, 且 GSH 水平也随之下降。另外, 长春新碱、丝裂霉素 C、放线菌素 D 及 VP-16 对 EAC/ADR 细胞内 GSH 水平均无明显影响。提示: GSH 水平增高, 可能是多药抗药性产生的机理之一。

关键词 阿霉素; 交叉抗药性; 多药抗药性; 谷胱甘肽

某些肿瘤对化疗药物产生抗药, 是肿瘤治疗失败的重要因素之一。为了克服肿瘤抗药性, 国外一些学者对抗药机理进行了较广泛的研究。发现抗药细胞常伴有膜 P-糖蛋白及编码该蛋白的 *mdr* 基因的过度表达⁽¹⁾; 有些则出现 DNA 拓扑异构酶的活性下降⁽²⁾; 还原型谷胱甘肽 (GSH) 及谷胱甘肽硫转移酶的活性不同程度的提高^(3,4)。为了进一步探讨抗药性产生的机理及寻找逆转剂, 我们建立了抗阿霉素的艾氏腹水癌动物体内模型 (EAC/ADR)⁽⁵⁾, 对其敏感细胞株 (EAC), 多药抗药细胞 (EAC/ADR) 及停用阿霉素治疗 36 周后, 恢复其部分敏感性细胞 EAC/ADR(R) 内 GSH 的水平进行了测定。

材料与 方法

药物及试剂 阿霉素 (adriamycin, ADR), 意大利 Farmitalia 公司提供; 长春新碱 (VCR), 由广州明兴药厂生产; 放线菌素 D, 上海新亚药厂生产; 丝裂霉素 C, 日本产; VP-16, 北京制药工业研究所药厂生产。还原型谷胱甘肽 (reduced glutathione, GSH), 中国科学院上海生化研究所生产; 邻苯二甲醛 (OPT), Fluka 公司生产; *N*-乙基顺丁烯二酰亚胺 (NEM), 中国科学院上海生化研究所生产; 其余试剂均为分析纯试剂。

仪器 用 Hitachi 850 型荧光分光光度计测定 GSH 含量。

动物 昆明种小鼠; 由河南医科大学动物中心提供; 体重 $20 \pm 2 \text{ g}$, ♀♂ 兼用。

按文献^(6,7)方法稍加改良使 EAC 细胞对 ADR 产生抗药性。剂量由 0.2 mg/kg 渐增到 7.5 mg/kg 后, 同时用其它不同类型的抗癌药物。对 EAC 治疗的有效剂量, 用于 EAC/ADR 及 EAC/ADR(R) 治疗, 统计敏感细胞及抗药细胞组动物的存活时间, 并进行显著性测定。

本文于 1993 年 3 月 30 日收到。

* 本课题属国家自然科学基金资助项目

细胞内还原型谷胱甘肽含量测定 按文献方法用荧光法直接测定^(8,9)。分别取 EAC, EAC/ADR 及 EAC/ADR(R) 腹水细胞各 5×10^6 个, 用冰冷 PBS 液洗涤 3 次, 加入 Na_3PO_4 -EDTA 缓冲液 (pH 8) 3.5 ml, 25% 偏磷酸 1 ml, 用超声波破碎细胞, 于 4°C , 4000 r/min 离心 15 min, 分离上清液, 置冰浴备用。GSH 的含量以 $\mu\text{g}/10^6$ 个细胞表示。用 Hitachi 850 型荧光分光光度计, 激发波长为 337.8 nm, 发射波长 421.6 nm 进行测定。

结 果

药物对 EAC, EAC/ADR 及 EAC/ADR(R) 细胞生长的影响

结果表明, EAC 细胞对 ADR 产生抗药性后, 同时用其他不同类型的抗肿瘤药物对 EAC/ADR 治疗, 也产生交叉抗药性, 但停止用 ADR 治疗 36 周, 又能使 EAC/ADR 细胞恢复其部分敏感性。经统计, EAC/ADR(R) 与 EAC/ADR 间均有明显差异 (表 1)。

Tab 1 Effect of drugs on survival time of EAC, EAC/ADR and EAC/ADR(R) cell line in mice

	Dose and schedule ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, ip)	Mean survival time (d, $\bar{x} \pm s$)		
		EAC	EAC/ADR	EAC/ADR(R)
Control	—	13.4 ± 1.1	13.8 ± 3.0	14.5 ± 2.1
Adriacycin	0.2 × 7	26.3 ± 2.5*	14.5 ± 3.1 Δ	24.1 ± 2.5*
	7.5 × 7	30.1 ± 2.3*	15.1 ± 2.1 Δ	21.3 ± 5.1*
Vincristine	0.1 × 7	31.0 ± 1.5*	14.7 ± 1.5 Δ	22.3 ± 3.1*
	0.2 × 7	32.1 ± 2.3*	16.7 ± 2.1 Δ	24.3 ± 2.5*
Actinomycin	0.05 × 7	25.8 ± 3.4*	12.5 ± 1.9 Δ	22.1 ± 3.1*
	0.03 × 7	22.0 ± 1.1*	11.0 ± 1.4 Δ	23.2 ± 2.1*
VP-16	5.0 × 7	27.1 ± 2.5*	12.5 ± 2.3 Δ	26.3 ± 3.5*
	7.5 × 7	30.0 ± 4.0**	16.8 ± 2.8 Δ	28.5 ± 3.5**
Mitomycin C	0.1 × 7	22.4 ± 3.1*	15.6 ± 3.7 Δ	25.3 ± 2.5*

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ compared with control; (R) 36 weekly passages without treatment after adriamycin resistance. $\Delta P < 0.05$ compared with EAC/ADR(R).

肿瘤细胞内 GSH 的含量测定

按文献⁽⁹⁾方法, 于每次实验同时做标准曲线。将肿瘤细胞经超声波破碎后, 离心, 取上清液, 测定 GSH 含量, 结果见表 2。

结果表明, EAC/ADR 细胞内 GSH 的含量较 EAC 细胞明显提高, 前者为后者的 4 倍, 经统计处理两者有明显差异; 而 EAC/ADR(R) 细胞内 GSH 水平与 EAC/ADR 相比则明显降低, 但仍稍高于 EAC 细胞。

Tab 2 Comparison of glutathione(GSH) content in EAC, EAC/ADR and EAC/ADR(R) cell lines ($\bar{x} \pm s$)

Cell lines	GSH content ($\mu\text{g}/10^6$ cell)
EAC	0.31 ± 0.21
EAC/ADR	1.25 ± 0.35**
EAC/ADR(R)	0.45 ± 0.15

** $P < 0.01$, compared with EAC and EAC/ADR(R).

(R): 36 weekly passages without treatment after adriamycin resistance.

多种药物交叉抗药对 EAC/ADR 细胞内 GSH 的影响

用 VCR, 丝裂霉素 C, 放线菌素 D, ADR 及 VP-16 的不同剂量对荷 EAC/ADR 细胞的小鼠进行治疗, (ip, qd \times 7 d), 于 d 8 自小鼠腹腔内抽取腹水细胞, 测定其 GSH 的含量, 其结果见表 3。

结果表明, 以上各药的不同剂量对 EAC/ADR 细胞内的 GSH 水平均无明显影响, 与对照组相比无差异。

Tab 3 Effect of drugs on glutathione(GSH) in EAC/ADR cell line in mice (n=10, $\bar{x}\pm s$)

	Dose and schedule (mg \cdot kg ⁻¹ \cdot d ⁻¹ , ip)	GSH content (μ g/10 ⁶ cell)
Control	—	1.15 \pm 0.15
Adriamycin	7.5 \times 5	1.25 \pm 0.21
Vincristine	0.1 \times 5	1.15 \pm 0.31
	0.2 \times 5	1.05 \pm 0.21
Mitomycin C	0.1 \times 5	1.29 \pm 0.32
	0.2 \times 5	1.38 \pm 0.25
VP-16	2.5 \times 5	0.98 \pm 0.22
	5.0 \times 5	0.91 \pm 0.15

讨 论

谷胱甘肽是机体中含量较高的一种含巯基的三肽, 有还原型及氧化型两种, 其主要功能为保护氧化剂对巯基的破坏, 保护细胞膜中含巯基的蛋白质和含巯基酶不被氧化。本文利用荧光法测定细胞内 GSH 的含量, 发现 EAC/ADR 细胞内 GSH 含量比 EAC 细胞明显增高, 其机理可能是细胞自身的保护现象。

EAC 细胞株对 ADR 产生抗药性后, 停止用 ADR 治疗, 时间达 36 周, 然后再用 ADR 治疗, 使 EAC/ADR 细胞恢复其部分敏感性, 同时细胞内 GSH 含量也明显降低。另外, 用丝裂霉素 C, 放线菌素 D, VCR 及 VP-16 对 EAC/ADR 细胞进行治疗, 均产生完全交叉抗药性, 同时对 EAC/ADR 细胞内 GSH 的含量也均无明显影响。充分表明, 多药抗药性的产生, 可能与 GSH 的水平有一定关系。由于细胞内 GSH 水平的升高, 可能使损伤 DNA 修复加速, 因许多抗肿瘤药物的作用靶点都在 DNA 上, 是否还有其他因素, 有待进一步深入研讨。

参 考 文 献

- 1 Jvliano RL and Ling VA, A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochem Biophys Acta* 1976;455:152.
- 2 Kaye SB. The multidrug resistance phenotype. *Br J Cancer* 1988;58:691.
- 3 Somfai-Relle S, et al. Glutathione-conferred resistance to antineoplastic agents: Approaches toward its reduction. *Cancer Treat Rev* 1984;11:43.
- 4 Wolf CR, et al. The role of glutathione in determining the response of normal and tumour cells to anticancer drugs. *Biochem Soc Trans* 1987;15:728.
- 5 王庆端, 等. 阿霉素对艾氏腹水癌细胞产生多药抗药性的研究. *中国药理学通报* 1993;9:122.

- 6 Dan K, et al. Development of resistance to daunomycin (NSC—82151) in Ehrlich ascites tumor. *Cancer Chemother Rep* 1971;55: 133.
- 7 Dan K, et al. Development of resistance to adriamycin (NSC—123127) in Ehrlich ascites tumor *in vivo*. *Ibid* 1972;56: 321.
- 8 Hisson PJ, et al. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione. *Anal Biochem* 1976;74: 214.
- 9 沈惠麒,等. 组织中谷胱甘肽的荧光测定法. 中华劳动卫生职业病杂志 1988;6: 103.

THE CORRELATION BETWEEN MULTIDRUG RESISTANCE AND GLUTATHIONE (GSH) IN EAC, EAC/ADR AND EAC/ADR(R) CELL LINES

QD Wang, GD Li, MJ Liu, Y Zhang, J Liu and TM Zhang

(Henan Institute of Medical Sciences, Zhengzhou 450052)

ABSTRACT Determination of GSH was performed by a modified fluorometric method. The experiments showed that the GSH content in resistant cell line(EAC/ADR) was 4 fold higher than that in sensitive cell line(EAC), being $1.25 \pm 0.35 \mu\text{g}/10^6$ cells in EAC/ADR and $0.31 \pm 0.12 \mu\text{g}/10^6$ cells in EAC. When the drug treatment was discontinued for 36 weeks, the sensitivity was partially recovered and the GSH level in EAC/ADR(R) cell parallely decreased. In addition, vincristine, mitomycin C, actinomycin D and VP-16 showed no effect on the GSH content in the EAC/ADR cell.

Key words Adriamycin; Cross resistance; Multidrug resistance; Glutathione