DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.05.007

丁硫氨酸亚砜胺逆转多重抗药细胞的抗性作用及其作用机理的研究

胡义德 钱桂生 金一尊* (第三军医大学附属新桥医院呼吸内科研究所)重庆,630037

提 要 应用阿霉素诱导的人肺腺癌A_{549}多重抗药细胞A_{549}/R_2,对丁硫氨酸亚砜胺(BSO)逆转多重抗药细胞的抗性作用及其作用机理进行了初步探讨。研究发现:非细胞抑制剂量BSO能使A_{549}/R_2细胞的IC_{50}值显著下降($P<0.01$);大剂量BSO能直接抑制癌细胞增殖,且对抗药细胞更有效;A_{549}/R_2细胞内总体谷胱甘肽(GSH)含量和谷胱甘肽S-转移酶(GST)活性均非常显著地高于其敏感细胞(A_{549}/P)水平($P<0.01$);BSO能使A_{549}/R_2细胞内总GSH含量和GST活性非常显著地下降($P<0.01$)。结果表明:BSO能有效地逆转A_{549}/R_2细胞的抗药性或对其直接产生细胞毒作用;BSO阻断细胞内GSH合成,降低抗药细胞内GSH水平或干扰GST活性,是对抗药细胞产生抗药性逆转或发挥直接杀伤效应的重要原因。

关键词 肺肿瘤;肺腺癌;多重抗药性;丁硫氨酸亚砜胺
中图法分类号 R734.2

肿瘤细胞的多重抗药性(Multidrug Resistance,MDR)是导致恶性肿瘤化疗失败的重要原因之一[1]。目前,国内外学者对肿瘤抗药性逆转剂的研究十分重视。本文以阿霉素(ADM)诱导的人肺腺癌A_{549}多重抗药细胞为对象,对谷胱甘肽(GSH)合成抑制剂丁硫氨酸亚砜胺(Buthionine Sulfoximine,BSO)逆转多重抗药细胞的抗性作用及其作用机理进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 细胞系和细胞培养

亲代人肺腺癌A_{549}细胞系(A_{549}/P)引自军事医学科学院;经ADM诱导的MDR细胞——A_{549}/R_2,由本实验室建立[2]。细胞均培养在含有15%小牛血清、青-链霉素(各100 U/ml)的RPMI-1640培养液中,置37℃、饱和湿度含5%CO_2和95%空气的CO_2孵箱中无菌培养。

1.2 药品

ADM为意大利Farmitalia产品;BSO由上海市放射医学研究所惠赠。

1.3 IC_{50}测定

在24孔细胞培养板上,每孔接种4×10^4细胞,静置培养6 h后加入不同浓度的药物,培养5 d后用台盼蓝染色行活细胞计数,计算各药物浓度下的细胞生长抑制率,用直线回归法推算药物作用的50%抑制浓度即IC_{50}。

1.4 细胞内总体GSH含量测定

对数增殖期细胞单层经0.125%胰蛋白酶消化、离心,细胞沉淀用PBS缓冲液(pH7.40)洗涤2次,再离心后细胞沉淀用5%冰浴三氯醋酸悬浮,制成匀浆,4℃ 10 000×g,离心15 min,取上清液参照Tietze法[3]测定细胞总体GSH含量。结果以μg/mg蛋白质表示。

1.5 细胞内谷胱甘肽S-转移酶(GST)活性测定

细胞收集、洗涤同上。所得细胞沉淀用4 ml 50 mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH7.40,含0.25 mol/L蔗糖)悬浮制成匀浆,4℃ 105 000×g,离心20 min,取上清液参照Adachi法[4]测定GST活性。

1.6 蛋白质含量测定

用考马斯亮蓝法,以牛血清白蛋白为标准。

2 实验结果

2.1 BSO的直接抑癌剂量

BSO浓度在200 μg/ml以下时,对A_{549}/P和A_{549}/R_2细胞增殖均无影响,但在2000 μg/ml以上时,对两组细胞均具有显著的增殖抑制作用。

2.2 非细胞抑制剂量BSO对细胞抗药性的逆转

以200 μg/ml剂量BSO与系列浓度ADM联合应用,测得ADM对A_{549}/R_2细胞作用的IC_{50}值由0.0988±0.0102 μg/ml($n=8$)降至0.0186±0.0127 μg/ml($n=8$)($P<0.01$),但对A_{549}/P细胞作用的IC_{50}值无影响。

2.3 细胞抑制剂量BSO/ADM对A_{549}/P细胞的作用(见表1)

表1 细胞抑制剂量BSO/ADM对A_{549}/P细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s$,$n=3$)

Tab 1 Effect of cell-inhibition dose of BSO/ADM on A_{549}/P cell-growth ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

BSO (μg/ml)	Cell number (×10⁴/ml)	
	ADM (0)	ADM (0.02 μg/ml)
0	18.5±1.9	10.0±1.8▲
2000	19.3±3.1☆	9.7±2.5★△
3000	18.3±1.5☆	9.3±1.5★△
4000	17.3±3.2☆	8.7±3.8★△
5000	16.0±2.7☆	8.3±1.5★△

▲:$P<0.01$ *vs* control (BSO=0, ADM=0); ☆:$P>0.05$ *vs* control; △:$P>0.05$ *vs* BSO=0; ★:$P<0.01$ *vs* ADM=0

* 上海市放射医学研究所 上海,200000

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.4 细胞抑制剂量 BSO/ADM 对 A_{549}/R_2 细胞的作用(见表2)

表 2 细胞抑制剂量 BSO/ADM 对 A_{549}/R_2 细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab 2 Effect of cell-inhibition dose of BSO/ADM on A_{549}/R_2 cell-growth ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

BSO (μg/ml)	Cell number ($\times 10^4$/ml)	
	ADM (0)	ADM (0.02 μg/ml)
0	18.8±3.9	18.0±3.5▲
2000	16.3±1.6	15.7±1.6★
3000	14.7±3.1	13.7±4.1★
4000	12.7±2.6☆	12.3±1.6★△
5000	9.6±2.1☆	9.0±1.7★△

▲: $P>0.05$ *vs* control; ☆: $P<0.01$ *vs* control; ★: $P>0.05$ *vs* (ADM=0); △: $P<0.01$ *vs* BSO=0

2.5 细胞内总体 GSH 含量变化(见表3)

表 3 BSO 对细胞内 GSH 含量的影响($\bar{x}\pm s$, $n=7$)

Tab 3 Effects of BSO on intracellular GSH content ($\bar{x}\pm s$, $n=7$)

BSO (μg/ml)	GSH content (μg/mg·protein)		P
	A_{549}/P	A_{549}/R_2	
0	1.01±0.23	3.34±0.51	<0.01
200	0.48±0.16	0.86±0.20	<0.05
P	<0.01	<0.01	

2.6 细胞内 GST 活性变化(见表4)

表 4 BSO 对细胞内 GST 活性的影响($\bar{x}\pm s$, $n=7$)

Tab 4 Effects of BSO on intracellular glutathione S-transferases (GST) activity ($\bar{x}\pm s$, $n=7$)

BSO (μg/ml)	GST activity (IU/L)		P
	A_{549}/P	A_{549}/R_2	
0	26.43±2.88	56.43±6.95	<0.01
200	21.43±3.36	39.71±5.56	<0.01
P	>0.05	<0.01	

3 讨论

3.1 BSO 逆转肿瘤抗药性的理论基础

GSH 是存在于生物细胞内最重要的非蛋白巯基化合物,其主要特点是具有活性巯基和 γ-谷氨酰键,从而能对抗正常肽酶活性。GSH 的氧化还原状态与宿主细胞的分化、DNA 修复、转录因子激活、钙稳态和损伤保护等功能有着密切关系。GST 是属机体 I 相代谢酶中催化 GSH 与亲电性物质发生结合的一类酶系。因此,在生物体内,GSH 与 GST 有机地配合,在保护生物细胞免遭毒物(包括细胞毒药物)损伤方面起重要作用。由于环境致癌物和化疗抗癌药物多为亲电性物质,因此,通过 GST 催化这些物质与 GSH 的结合反应,一方面提高了机体的解毒、抗氧化能力,从而降低肿瘤的发生;另一方面也增强了机体以及癌细胞对抗癌药物的分解代谢能力,使癌细胞产生抗药性[5]。因此,对那些 GSH 水平和 GST 活性较高的肿瘤,采用它们的合成/或活性抑制剂以及应用非反应底物的抗癌剂治疗,有希望提高临床化疗效果。

BSO 是一种人工合成的氨基酸,它是 γ-谷氨酰-半胱氨酸合成酶(γ-glutamyl-cysteine-synthetase)的不可逆性抑制剂,能阻断细胞 GSH 合成,从而降低细胞内 GSH 水平,有可能增强抗癌药物的细胞毒性[6]。

3.2 BSO 逆转 MDR 细胞的抗性作用效果评价

本研究发现,BSO 浓度在200 μg/ml 以下时,对 A_{549}/P 和 A_{549}/R_2 细胞均无直接抑制作用。以200 μg/ml 剂量 BSO 与系列浓度 ADM 合用,测得 ADM 对 A_{549}/R_2 细胞作用的 IC_{50} 值明显下降。表明非细胞抑制剂量 BSO 能有效地逆转 A_{549}/R_2 细胞的抗药性。而 BSO 浓度在2000 μg/ml 以上时,对 A_{549}/P 和 A_{549}/R_2 细胞增殖均有直接抑制作用。但 A_{549}/R_2 细胞更敏感,且与剂量呈正相关;细胞抑制剂量 BSO 与 ADM 联合应用,对 A_{549}/P 细胞主要表现为 ADM 的抑制作用,而对 A_{549}/R_2 细胞则主要表现为 BSO 的抑制作用,两者之间未见明显的协同抑制癌效果。研究结果表明,BSO 可单独直接用于肿瘤的治疗,且对具有抗药性的肿瘤疗效可能更佳。据文献报道,在整体条件下,以1 g/kg剂量 BSO,在24 h 内对荷瘤小鼠进行4次腹腔内注射,结果很快使肿瘤组织及其肝肾组织 GSH 水平降至对照组的20%以下,但在成年小鼠长期服用该剂量 BSO,并未引起心、脑、肝、肾组织细胞及其功能损害,仅个别出现轻度的口腔及结肠粘膜变性。这一令人鼓舞的结果的原因在于,当机体尤其是肝脏 GSH 水平下降时,可诱导肝细胞对抗坏血酸(Ascorbate)的合成,从而减轻因 GSH 缺乏而导致的组织细胞损害[7]。因此,BSO 不失为一种较安全而有效的抗药性逆转剂,具有较好的临床应用前景。目前,这一方面的研究尚处于体外及动物实验阶段。

3.3 BSO 逆转 MDR 细胞的抗性作用机理探讨

本研究发现,A_{549}/R_2 细胞内总体 GSH 含量是

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

A_{549}/P 细胞的3倍，GST 活性是 A_{549}/P 细胞的2倍；用非细胞抑制剂量 BSO 处理 A_{549}/R_2 细胞后，能使 A_{549}/R_2 细胞内 GSH 含量和 GST 活性分别下降74%和30%，同时能有效地逆转该细胞对 ADM 的抗药性。表明 A_{549}/R_2 细胞内 GSH 过度表达和 GST 活性增加是导致其产生 MDR 表型的重要原因之一。BSO 通过抑制癌细胞内 GSH 合成，同时也间接抑制了抗药细胞内 GST 活性，使抗癌药物－GSH 结合物形成减少，抗癌剂分解代谢减慢，对抗癌剂的细胞毒性代谢产物如自由基、过氧化氢等排泄速度减慢，从而使抗癌剂的细胞毒性增强，达到逆转肿瘤抗药性的目的[8,9]。而 BSO 的直接抑癌作用，可能是通过严重抑制癌细胞内 GSH 合成，使细胞内 GSH 耗竭，直接干扰 GSH/GSSG 平衡，导致细胞活力下降所致。

参考文献

1 Ling V. P-glycoprotein and resistance to anticancer drugs. Cancer，1992；69：2603

2 胡义德，钱桂生. 人肺腺癌 A_{549} 细胞系多重抗药性的形成. 第三军医大学学报，1994；16(2)：103

3 Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized GSH：application of mammalian blood and other tissues. Anal Biochem，1969；27：502

4 Adachi Y，Hor K，Takahashi Y et al. Serum GST activity in liver disease. Clin Chim Acta，1980；106：243

5 Dolphin D，Pulson R，Avramovic O. Glutathione. New York：John Wiley，1989：1～9

6 Bilzer M，Kranth-Seigel RL，Schirmer RH et al. Interaction of a glutathione s-conjugate with glutathione reductase. Eur J Biochem，1984；138：373

7 Meister A. Glutathione，ascorbate and cellular protection. Cancer Res (Suppl)，1994；54：1969s

8 Johnson SW，Ozels RF. Hamilton TC. Mechanisms of drug resistance in ovarian cancer. Cancer Supplement，1993；71(2)：644

9 Mistry P，Kelland LR，Agel G et al. The relationship between GSH，GST and cytotoxicity of platium drugs and melphalan in eight human ovarian carcinoma cell lines. Br J Cancer，1991；64：215

（收稿：1995-03-01；修回：1995-10-18）

Study of the effects and mechanisms in overcoming drug resistance of multidrug resistant cells with buthionine sulfoximine

Hu Yide，Qian Guisheng，Jin Yizun (Department of Respiratory Disease，Xinqiao Hospital，Third Military Medical University，Chongqing，630037)

Abstract　A preliminary study of the effects and mechanisms in overcoming drug resistance of an adriamycin-induced multidrug resistant variant of human lung adenocarcinoma (A_{549}/R_2) with buthionine sulfoximine (BSO) was performed. It was found that a non-cell inhibitory dosage of BSO could decrease IC_{50} of A_{549}/R_2 significantly ($P<0.01$). A large dosage of BSO could directly inhibit the multiplication of carcinoma cells especially A_{549}/R_2. Total glutathione (GSH) content and glutathionine S-transferase (GST) activity of A_{549}/R_2 were significantly higher than those of the parental cells but BSO could reduce cellular GSH content and GST activity significantly ($P<0.01$). These findings suggest that BSO can effectively overcome the drug resistance of A_{549}/R_2 through its cytotoxic effects on the cells. BSO can block GSH synthesis to reduce cellular GSH content and interfere in GST activity which is the important cause to reverse the drug resistance of drug-resistant cells or to kill the cells directly.

Key words　lung neoplasms；lung adenocarcinoma；multidrug resistance；buthionine sulfoximine

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net