

http://www.journals.zju.edu.cn/med

大鼠微粒体谷胱甘肽S-转移酶1对苯丁酸氮芥 体外致肿瘤细胞毒性的影响

陈哲, 叶子奇, 史强, 朱丹雁, 楼宜嘉

(浙江大学药学院 药理毒理与生化药学研究所, 浙江 杭州 310058)

[摘要] 目的: 基于苯丁酸氮芥(chlorambucil, CHB)激活微粒体谷胱甘肽S-转移酶1(microsomal glutathione S-transferase 1, mGST1)可显著加快催化CHB-GSH结合效应, 探讨大鼠mGST1激活对CHB致不同来源肿瘤细胞株毒性的影响。方法: 取雄性Sprague-Dawley大鼠肝脏, 制备微粒体, 去除胞浆GST的污染, 获得纯化mGST1并测其活性。分别设CHB组, CHB+GSH对照组以及CHB+GSH+mGST1组。分别与PC-3、K562、HepG2和P388D1细胞株培养24 h、48 h、72 h后, 以 IC_{50} 作为细胞损伤指标; 作用8 h后以JC-1染色评价线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)改变作为损伤早期指标; 作用48 h以后以AO/EB染色差异作为细胞核损伤后期指标。结果: 在mGST1存在环境下, 24 h、48 h、72 h PC-3、K562、HepG2和P388D1细胞株 IC_{50} 均有显著增加。72 h CHB+GSH对照组PC-3、K562、HepG2和P388D1细胞株的 IC_{50} 分别为 $(6.13 \pm 2.42) \mu\text{mol/L}$ 、 $(3.77 \pm 0.95) \mu\text{mol/L}$ 、 $(5.36 \pm 3.06) \mu\text{mol/L}$ 和 $(9.42 \pm 1.77) \mu\text{mol/L}$; CHB+GSH+mGST1组显著高于CHB+GSH对照组, 相应 IC_{50} $(15.01 \pm 3.47) \mu\text{mol/L}$ ($P < 0.001$)、 $(8.33 \pm 1.72) \mu\text{mol/L}$ ($P < 0.001$)、 $(26.74 \pm 5.45) \mu\text{mol/L}$ ($P < 0.001$)和 $(16.93 \pm 0.85) \mu\text{mol/L}$ ($P < 0.001$)。并伴有线粒体 $\Delta\Psi_m$ 降低和核损伤减轻, 呈明显的时效关系。结论: mGST1在富含GSH溶液中, 可显著降低CHB对上述肿瘤细胞株的细胞毒性作用。

[关键词] 谷胱甘肽转移酶; 微粒体; 苯丁酸氮芥/药理学; 肿瘤细胞, 培养的

[中图分类号] R 979.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2007)03-0236-05

Rat microsomal glutathione S-transferase 1 alters cytotoxic effects of chlorambucil on PC-3, K562, HepG2 and P388D1 cell lines

CHEN Zhe, YE Zi-qi, SHI Qiang, et al (Institute of Pharmacology & Toxicology and Biochemical Pharmaceutics, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the possible association between activation of rat microsomal glutathione S-transferase 1 (mGST1) and chlorambucil toxicity on selected cancer cell lines. **Methods:** Hepatic microsomes were prepared from male Sprague-Dawley rats and washed to

收稿日期: 2007-03-02 修回日期: 2007-04-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30070904, 30171121, 30472112)。

作者简介: 陈哲(1983—), 女, 博士研究生, 研究方向: 药物毒理学。

通讯作者: 楼宜嘉(1953—), 女, 药理学博士, 教授, 博士生导师, 主要研究领域: 心脑血管与肝脏药理, 干细胞生物学, 药物毒理学; E-mail: yijialou@zju.edu.cn.

remove cytosolic contamination. mGST1 was purified and its activity was measured. PC-3, K562, HepG2 and P388D1 cell lines were exposed to chlorambucil (CHB) alone or to CHB with mGST1 at concentrations of 0~100 $\mu\text{mol/L}$ for 8, 24, 48, 72 h. Cytotoxic effects of CHB were determined by cell growth inhibition (MTT assay), mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi\text{m}$), and fluorescence morphological examination (AO/EB staining). **Results:** The decreased cytotoxic effects of CHB on the cell lines altered by mGST1 were demonstrated in concentration- and time-dependant manners. The CHB-induced apoptosis on PC-3 and K562 cell lines altered by mGST1 was confirmed using $\Delta\Psi\text{m}$ examination, JC-1 or AO/EB staining. **Conclusion:** mGST1 can reduce the cytotoxic effects of CHB in selected cancer cell lines.

[**Key words**] Glutathione transferase; Microsomes; Chlorambucil/pharmacol; Tumor cells, cultured

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2007, 36(3):236-240.]

微粒体谷胱甘肽S-转移酶1(microsomal glutathione S-transferase 1, mGST1)是Ⅱ相药物代谢酶,具有3次跨膜结构,在体内催化还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)与亲电子物质结合,而具有解毒功能;催化氧化应激产物和GSH的结合,而执行抗脂质过氧化功能^[1-2]。mGST1第49位半胱氨酸(Cys49)可被亲电子剂修饰激活,显著增加上述催化活性,该特性与胞浆GST截然不同^[3-4]。

苯丁酸氮芥(chlorambucil, CHB)是一种双功能氮芥类烷化剂,广泛应用于卵巢癌、白血病及头部/颈部癌症的治疗,通过与细胞DNA交叉联结,发挥抗肿瘤作用^[5]。CHB具有亲电子作用,本课题组前期研究表明^[6-7],被CHB激活的mGST1具有显著加快催化CHB-GSH结合效应,但该现象是否影响CHB对肿瘤细胞毒性迄今未明。本研究选择不同肿瘤来源的PC-3(人前列腺癌)、K562(人白血病)、HepG2(人肝癌)和P388D1(小鼠巨噬细胞)细胞株,探索大鼠mGST1是否经加快催化CHB-GSH效应,降低CHB对肿瘤细胞株的毒性,旨在探索mGST1被CHB等亲电子烷化剂修饰激活后,对烷化剂体外抗肿瘤活性的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物 Sprague-Dawley 雄性大鼠5只,体重(200±20)g,由浙江大学实验动物中心

提供(二级,动物许可证号:医动字第20010014号),用于制备肝脏微粒体。

1.2 细胞株 PC-3、K562、HepG2和P388D1细胞株购自上海细胞所。

1.3 实验试剂和实验器材

1.3.1 实验试剂: CHB(Sigma公司),高糖DMEM培养基、1640培养基(Gibco, USA), β -巯基乙醇(Sigma公司),小牛、胎牛血清(杭州四季青公司),羟基磷灰石(上海伯奥生物科技有限公司), Sephadex G-25(fine)、CM-sepharose CL-6B(Amersham Biosciences), Triton X-100(上海生工生物工程有限公司), GSH、甘油(AMRECO公司), 2,4-二硝基氯苯(2,4-dinitrochloro benzene, CDNB; 上海试剂一厂), N-乙基马来酰亚胺(N-ethylmaleimide, NEM; Merck公司), JC-1(Sigma, USA), 3-(4, 5-二甲基-2-噻唑)-2,5-二苯基溴化四氮唑蓝(MTT, Amresco公司, Canada)等。

1.3.2 实验器材: 层析实验冷柜(YC-1, 北京博医康技术有限公司), 低温冷冻高速离心机(Heraeus, 德国), 荧光显微镜成像系统(Leica 300D型, Wetzlar, Germany)等。

1.4 实验方法

1.4.1 mGST1的纯化: 取大鼠肝脏制备微粒体蛋白,层析实验冷柜用0.15 mol/L Tris/HCl (pH 8.0)清洗2次,以降低胞浆GST的污染。羟基磷灰石和CM-琼脂糖凝胶辅以色谱法

纯化。

1.4.2 细胞培养及 CHB 细胞毒性测定: PC-3、K562、HepG2 和 P388D1 细胞株均含 10% 小牛血清 1640, HepG2 含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 常规培养。以 PC-3(5×10^3 /孔)、K562(4×10^3 /孔)、HepG2(6.5×10^3 /孔)、P388D1(6×10^3 /孔)的密度接种于 96 孔板。24 h 后加入 mGST1/CHB, CHB 终浓度为 0~100 $\mu\text{mol/L}$ 。设 CHB 组、CHB+GSH 对照组(mGST1 溶液的溶剂对照)以及 CHB+GSH+mGST1 组, 分别于培养 24、48、72 h 时, 用 MTT 法测定 CHB 对细胞毒性(IC_{50}), 相同实验重复 4 次。

1.4.3 线粒体膜电位($\Delta\Psi\text{m}$)检测: 加入 mGST1/CHB 培养 8 h 后, 加入 2.5 $\mu\text{g/ml}$ JC-1 染料, 37℃ 孵育 30 min, 荧光倒置显微镜观察, 以细胞质出现红色荧光计为正常线粒体膜电位, 出现绿色荧光计为线粒体膜电位降低。

1.4.4 细胞核损伤检测: 加入 mGST1/CHB 培养 48 h 后, 各组细胞加入 10 $\mu\text{g/ml}$ AO/EB

染料, 37℃ 孵育 5 min, 荧光倒置显微镜观察, 以细胞核区出现绿色荧光计为正常细胞, 橙黄色荧光计为凋亡细胞, 红色荧光计为死亡细胞。

1.5 统计学处理 IC_{50} 采用药物抑制浓度计算软件(LOGIT 法, 10.0 版本)。实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS 10.0 统计软件进行 one-way ANOVA 检验, 若有显著性差异, 两两比较采用 q 检验。 $P<0.05$ 为统计学上有显著性差异。

2 结 果

2.1 mGST1 对 CHB 细胞毒性的影响
mGST1/CHB 作用于细胞株 24、48、72 h 后, MTT 结果显示, 与 CHB+GSH 组相比, CHB+GSH+mGST1 组 IC_{50} 均有显著增加, 且呈良好的时效关系, 提示在富含 GSH 的缓冲液体系中加入 mGST1 后, CHB 对 PC-3、K562、HepG2 和 P388D1 细胞株的细胞毒性作用显著下降。见表 1, 图 1。

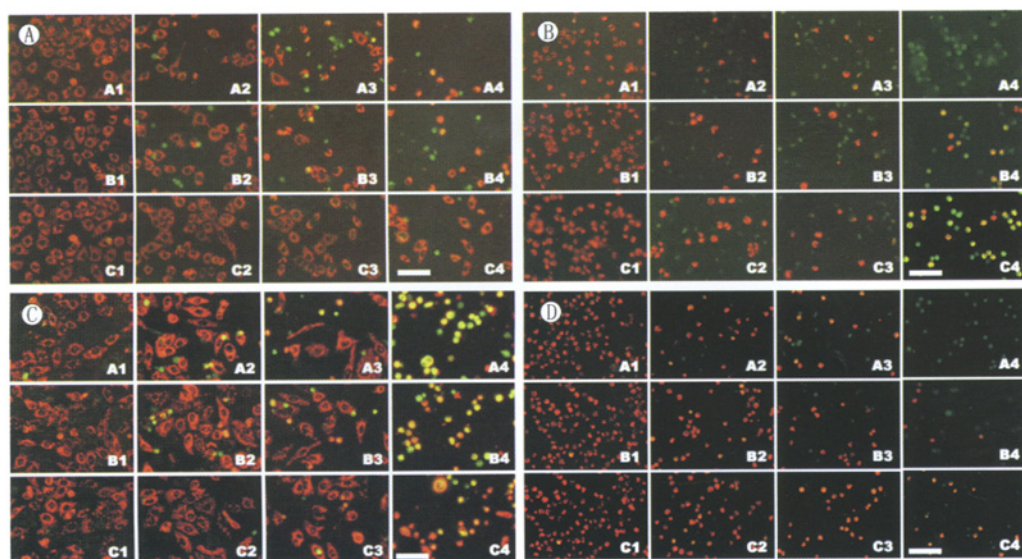
表 1 mGST1 对苯丁酸氮芥细胞毒性作用的影响
Table 1 Cytotoxic effects of CHB affected by rat mGST1 treatment

(n=4, $\bar{x} \pm s$, IC ₅₀ , $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)						
组 别	PC-3			K562		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
CHB	4.49±0.29	2.81±0.17	2.52±1.60	4.84±1.52	2.99±0.35	1.01±0.42
CHB+GSH	20.74±0.20 ^{***}	4.60±0.17	6.13±2.42	9.92±0.53 ^{**}	4.59±0.32	3.77±0.95 [*]
CHB+GSH+mGST1	28.31±0.59 ^{****}	15.72±1.79 ^{****}	15.01±3.47 ^{****}	17.94±1.26 ^{****}	15.25±2.31 ^{****}	8.33±1.72 ^{****}
组 别	HepG2			P388D1		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
CHB	33.58±2.03	12.24±1.24	2.31±0.38	10.24±1.75	8.01±0.27	4.60±2.89
CHB+GSH	53.79±4.58 ^{**}	24.64±6.87 [*]	5.36±3.06	10.51±1.66	10.22±0.85 [*]	9.42±1.77 [*]
CHB+GSH+mGST1	66.70±5.05 ^{****}	41.76±3.81 ^{****}	26.74±5.45 ^{****}	28.85±1.33 ^{****}	21.41±1.55 ^{****}	16.93±0.85 ^{****}

vs CHB 组, *** $P<0.001$, ** $P<0.01$, * $P<0.05$; vs CHB+GSH 组, **** $P<0.001$

2.2 mGST1 对 CHB 致细胞线粒体 $\Delta\Psi\text{m}$ 降低的影响 mGST1/CHB 作用于细胞 8 h 后, JC-1 染色结果显示, 随着 CHB 浓度增加, 表征线粒体 $\Delta\Psi\text{m}$ 下降的绿色荧光增多, 表征线粒体 $\Delta\Psi\text{m}$ 正常的红色荧光减少, 呈量效关系。与

CHB+GSH 组相比, CHB+GSH+mGST1 组呈现明显的对抗线粒体 $\Delta\Psi\text{m}$ 下降趋势, 且呈量效关系。提示在富含 GSH 的环境中, mGST1 存在可降低 CHB 致细胞线粒体 $\Delta\Psi\text{m}$ 损伤作用(图 1A~D)。



A:PC-3 细胞株;B:K562 细胞株;C:HepG2 细胞株;D:P388D1 细胞株。

A1~A4:CHB 组(A1:CHB 0 $\mu\text{mol/L}$,A2:CHB 1 $\mu\text{mol/L}$,A3:CHB 3 $\mu\text{mol/L}$,A4:CHB 10 $\mu\text{mol/L}$); B1~B4:CHB+GSH 组(B1:CHB 0 $\mu\text{mol/L}$ +GSH,B2:CHB 1 $\mu\text{mol/L}$ +GSH,B3:CHB 3 $\mu\text{mol/L}$ +GSH, B4:CHB 10 $\mu\text{mol/L}$ +GSH);C1~C4:CHB+GSH+mGST1 组(C1:CHB 0 $\mu\text{mol/L}$ +GSH+mGST1,C2: CHB 1 $\mu\text{mol/L}$ +GSH+mGST1,C3:CHB 3 $\mu\text{mol/L}$ +GSH+mGST1,C4:CHB 10 $\mu\text{mol/L}$ +GSH+mGST1)。(Bar=100 μm)

图1 mGST1 对苯丁酸氮芥致PC-3、K562、HepG2 和P388D1 细胞线粒体膜电位($\Delta\Psi\text{m}$)损伤的保护作用(8 h)

Fig. 1 The CHB-induced mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi\text{m}$) on HepG2, P388D1,PC-3 and K562 cell lines affected by rat mGST1 using JC-1 staining (8 h)

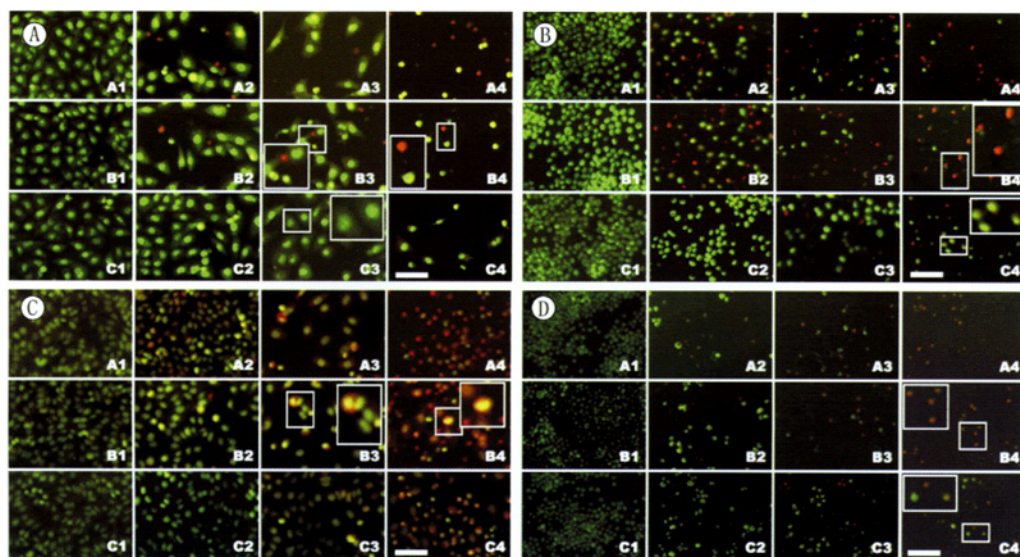
2.3 mGST1 对 CHB 致细胞核损伤的影响

mGST1/CHB 作用于 PC-3、K562、HepG2 和 P388D1 细胞 48 h 后,AO/EB 染色结果显示,随着 CHB 浓度增加,正常的绿色荧光细胞数减少,损伤的橙黄色/红色荧光细胞数增多,呈量效关系,表明部分细胞核内遗传物质发生断裂,细胞出现损伤。与 CHB+GSH 组相比,CHB+GSH+mGST1 组呈现明显的降低细胞损伤的趋势,且呈量效关系。提示 mGST1 激活可降低对 CHB 致细胞损伤作用(图 2A~D)。

3 讨论

mGST1 是一个Ⅱ相药物代谢酶,具有 3 次跨膜结构,在体内执行“双重功能”,可分别催化以下反应:①催化 GSH 与亲电子物质的结合,从而发挥解毒功能;②催化氧化应激产物和 GSH 结合,使前者灭活,从而执行抗脂质过氧化功能。

该酶在一级结构、空间构象、免疫反应特性、基因表达、活性调控,以及催化功能等方面均与胞浆 GST 蛋白超家族差异很大。尤其重要的是 mGST1 分子 Cys49 可被亲电子剂等修饰激活,显著增加催化 GSH 与亲电子物质结合活性,该特性与胞浆 GST 截然不同^[3-4]。根据该特性本课题前期用液相色谱/电喷雾离子化质谱组合方法(LC/ESI/MS),证实了 mGST1 与亲电子烷化剂 CHB 共存时,加快 GSH-CHB 酶促反应。呈现底物 CHB 与 GSH 结合的各种产物,如 CHBSG₂、CHBSG、CHBSGOH 增加而 CHB 减少的现象,提示在与 GSH 共存体系中,mGST1 具有显著加快催化 CHB-GSH 的结合效应^[6-7]。根据前期研究结果,推测 CHB-GSH 的显著增加,必定导致 CHB 的细胞毒性作用显著下降,本研究旨在探索 mGST1 被 CHB 等烷化剂修饰激活后,对烷化剂体外抗肿瘤活性的影响。



A:PC-3 细胞株;B:K562 细胞株;C:HepG2 细胞株;D:P338D1 细胞株。

A1~A4:CHB 组(A1:CHB 0 $\mu\text{mol/L}$, A2:CHB 1 $\mu\text{mol/L}$, A3:CHB 3 $\mu\text{mol/L}$, A4:CHB 10 $\mu\text{mol/L}$); B1~B4:CHB+GSH 组(B1:CHB 0 $\mu\text{mol/L}$ +GSH, B2:CHB 1 $\mu\text{mol/L}$ +GSH, B3:CHB 3 $\mu\text{mol/L}$ +GSH, B4:CHB 10 $\mu\text{mol/L}$ +GSH); C1~C4:CHB+GSH+mGST1 组(C1:CHB 0 $\mu\text{mol/L}$ +GSH+mGST1, C2:CHB 1 $\mu\text{mol/L}$ +GSH+mGST1, C3:CHB 3 $\mu\text{mol/L}$ +GSH+mGST1, C4:CHB 10 $\mu\text{mol/L}$ +GSH+mGST1)。(Bar=100 μm)

图2 mGST1对苯丁酸氮芥致PC-3、K562、HepG2和P338D1细胞损伤的保护作用(48 h)

Fig. 2 The CHB-induced apoptosis on HepG2, P338D1, PC-3 and K562 cell lines affected by rat mGST1 using AO/EB staining (48 h)

mGST1 纯酶只有在富含 GSH 的缓冲液中才能保持活性,因此本研究设立 CHB+GSH 缓冲液对照组。为增加上述结果在不同肿瘤生物学特性的细胞适用性,本研究采用 PC-3、K562、HepG2 和 P338D1 4 株细胞,用 IC_{50} 值大小评价 CHB 细胞毒性,用 JC-1 染色观察 CHB 致细胞线粒体 $\Delta\Psi_{\text{m}}$ 变化,用 AO/EB 染色观察 CHB 对细胞核损伤程度。结果表明,与 CHB+GSH 组相比,CHB+GSH+mGST1 组培养 24、48、72 h,4 株细胞的 IC_{50} 均有显著增加,并同时伴有显著改善 CHB 致细胞线粒体 $\Delta\Psi_{\text{m}}$ 降低和对细胞核损伤作用,且呈量效关系。在细胞层面证实了 CHB-GSH 产物显著增加,必然导致 CHB 细胞毒性作用显著下降的假说,因而本研究对补充完善 mGST1 对烷化剂体外抗肿瘤活性的影响提供了实验依据。

References:

- [1] ANIYA Y, ANDERS M W. Activation of rat liver microsomal glutathione S-transferase by hydrogen peroxide: role for protein-dimer formation [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1992, 296: 611-616.
- [2] MORGENSTERN R, DEPIERRE J W, ERNSTER L. Activation of microsomal glutathione S-transferase activity by sulfhydryl reagents [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1979, 87: 657-663.
- [3] MORGENSTERN R, GUTHENBERG C, DEPIERRE J W. Microsomal glutathione S-transferase: Purification, initial characterization and demonstration that it is not identical to the cytosolic glutathione S-transferases A, B and C [J]. *Eur J Biochem*, 1982, 128: 243-248.

(下转第246页)

